

# Aspekte der Protein-Nukleinsäure- Erkennung am Beispiel der Restriktionsendonuklease EcoRI (Kurzfassung)

Maaß, Günter

Veröffentlicht in:  
Jahrbuch 1987 der Braunschweigischen  
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.103-105



Verlag Erich Goltze KG, Göttingen

9.10.1987 in Braunschweig

## **Aspekte der Protein-Nukleinsäure-Erkennung am Beispiel der Restriktionsendonuklease EcoRI**

**(Kurzfassung)**

**Von Günter Maaß**

Die spezifische Erkennung bestimmter Nukleinsäuresequenzen durch Proteine ist ein zentrales Problem der Molekularbiologie. Sie ist eine Voraussetzung für den reibungslosen Ablauf von Replikation, Transkription und Translation der genetischen Information in der Zelle, genauso wie sie unabdingbar ist für das gezielte Schneiden der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in der Gentechnologie mithilfe bestimmter Enzyme, der Restriktionsendonukleasen. Am Beispiel eines solchen Enzyms, der Restriktionsendonuklease EcoRI, sollen einige wichtige Grundprinzipien der Protein-Nukleinsäurewechselwirkung erläutert werden.

Dieses Enzym besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die zur Erkennung und Spaltung der palindromen DNA-Sequenz

GAATTC

CTTAAG

zusammenwirken müssen. A, G, T, C sind die Nukleinsäurebasen. Das Enzym benötigt zu seiner katalytischen Funktion  $Mg^{2+}$  als Cofaktor. Es spaltet die doppelsträngige DNA-Sequenz an den markierten Positionen. Bei statistischer Verteilung der vier Nukleinsäurebasen findet man eine Sechsersequenz jedes 4096te Basenpaar. Diese Sequenz muß aus einer Vielzahl für das betreffende Enzym unspezifischer Sequenzen herausgefunden werden.

Aus vielen Untersuchungen an anderen Nukleinsäure bindenden Proteinen ist bekannt, daß diese an unspezifische Nukleinsäuresequenzen zwar stark binden, an spezifische Sequenzen jedoch viele Größenordnungen stärker. Dabei konnte gezeigt werden, daß die unspezifische Wechselwirkung im wesentlichen elektrostatischer Natur ist, während zur spezifischen Erkennung insbesondere Wasserstoffbrücken zwischen entsprechenden Donor- und Akzeptorgruppen der DNA-Doppelhelix einerseits und den Aminosäureketten und Peptidgruppierungen des Proteins andererseits verantwortlich sind. Dieses Prinzip gilt auch für das Restriktionsenzym EcoRI. Wie durch chemische Modifikationen insbesondere an den Nukleinsäurebasen der Erkennungssequenz und durch Röntgenstrukturanalyse des Kristalls aus Enzym und eines tridekameren Oligonukleotids gezeigt wurde, besteht die Erkennungsmatrix aus zwölf Wasserstoffbrücken, wobei die beteiligten Gruppen an den Nukleinsäurebasen und im Protein identifiziert werden konnten.

Die für diesen spezifischen Komplex gefundene thermodynamische Stabilität von ca.  $10^9 \text{ M}^{-1}$  gegenüber  $10^6 \text{ M}^{-1}$  für die unspezifische Bindung reicht jedoch nicht aus, um die unter normalen Bedingungen gefundene extrem niedrige Fehlerrate bei der DNA-Spaltung zu erklären. Nun kann ein Enzym seine hohe Spezifität gegenüber

seiner Erkennungssequenz nicht nur über eine hohe spezifische Bindung, sondern auch über seine kinetischen Fähigkeiten erreichen, indem es von mehreren Reaktionswegen nur einen auswählt und nur hier die Reaktion mit optimaler Geschwindigkeit abläuft.

Detaillierte kinetische Untersuchungen haben zu dem Ergebnis geführt, daß die Spaltung der Phosphoesterbindung zwischen den Nukleinsäurebasen G und A mit einer Geschwindigkeit von  $0,35 \text{ sec}^{-1}$  erfolgt. Diese Geschwindigkeit hängt aber noch von der Basenzusammensetzung in unmittelbarer Nachbarschaft der kanonischen Sequenz ab, in dem Sinne, daß G-reiche Sequenzen gegenüber A-reichen die Reaktionsgeschwindigkeit um etwa eine Größenordnung verringern.

Neben den Nukleinsäuresequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft der Erkennungsstelle können jedoch auch weiter entfernte Sequenzen dazu beitragen, die Zielsequenz zu erreichen. Durch umfangreiche Untersuchungen konnten wir zeigen, daß die unspezifische Bindung die Voraussetzung für die lineare Diffusion auf der doppelsträngigen DNA darstellt. Mit der experimentell bestimmten Diffusionskonstanten von  $5 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ sec}^{-1}$  und einer Dissoziationsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes von  $10 \text{ sec}^{-1}$  errechnet sich, daß das Enzym während seiner Bindung an die DNA über etwa 1000 Basenpaare hinweg diffundiert, bevor es abdissoziiert. Damit wird ein Enzym, das im Abstand von 1000 Basenpaaren links oder rechts von der Erkennungssequenz auf die DNA auftritt, sein Ziel finden.

Wie wir ferner durch Einsatz der Verfahren der schnellen Kinetik zeigen konnten, ist für die Erkennung der spezifischen Sequenz eine der Spaltung vorgelagerte Konformationsumwandlung des Enzyms erforderlich. Diese Konformationsumwandlung wird nicht beobachtet bei der Bindung des Proteins an unspezifische DNA-Sequenzen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß in diesem Fall die Spezifität nicht allein thermodynamisch zu beschreiben ist, sondern daß vielmehr der Bindung nachgelagerte Reaktionen spezifitätsbestimmend sein müssen.

Detaillierte Aussagen über die im Erkennungsprozeß beteiligten Wechselwirkungen können aus chemischen Modifikationsstudien an der DNA und an der Proteinstruktur gewonnen werden. Während chemische Modifikationen an Nukleinsäuren mithilfe moderner Syntheseverfahren verhältnismäßig einfach durchgeführt werden können, kann eine gezielte Mutation einer bestimmten Aminosäure in der Proteinkette nur unter Einsatz molekularbiologischer und insbesondere gentechnologischer Verfahren erreicht werden. Hierzu müssen nicht nur das betreffende Gen und die Primärsequenz des Proteins bekannt sein, sondern es sollte auch eine möglichst weitgehende Kenntnis der räumlichen Struktur des Proteins und/oder des Protein-Nukleinsäure Komplexes vorliegen. Eine  $3\text{\AA}$ -Röntgenstrukturanalyse eines EcoRI-DNA Komplexes wurde Ende 1986 von J. Rosenberg veröffentlicht. Durch Kombination der genannten Verfahren konnte gezeigt werden, daß die sequenzspezifische Erkennung der kanonischen Hexanukleotidsequenz – GAATTC – durch 12 Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren Glu 144, Arg 145, Arg 200 und den Purinbasen GAA der zweifach symmetrischen DNA-Sequenz über die große Grube der DNA erfolgt. Dabei arbeiten die beiden Untereinheiten des Enzyms Hand in Hand zusammen, indem jeweils ein Paar benachbarter A's über Wasserstoffbrücken zum Glu 144 der einen

Untereinheit bzw. zum Arg 145 der anderen verbunden ist. Nur die äußere Base G wird von jeweils einer Untereinheit über Wasserstoffbrückenbindung an die Aminosäure Arg 200 erkannt.

Neben diesem nunmehr relativ gut festgelegten „Erkennungsmotiv“ ist zur Zeit noch unklar, welche Aminosäuren in welcher räumlichen Proteindomäne das „Spaltungsmotiv“ für die Spaltung der beiden Posphoesterbindungen bilden. Die Lösung dieser Frage wird zur Zeit in unserem Institut durch Einsatz der Verfahren der gezielten Mutagenese angestrebt.

Die sehr hohe Sequenzspezifität der EcoRI Restriktionsendonuklease ist die Folge einer Reihe einzelner Schritte wie unspezifischer DNA-Bindung, linearer Diffusion und einer Konformationsumwandlung des Proteins als Voraussetzung für die Ausbildung der Wasserstoffbrücken im spezifischen Komplex. Mit zunehmendem Verständnis von Struktur und Funktion bei der EcoRI sollte es möglich sein, zu einem besseren Verständnis von Protein-Nukleinsäure Erkennungsprozessen zu kommen und herauszufinden, ob individuellen Erkennungsmechanismen ein genereller DNA Erkennungscode zugrunde liegt.